



# **دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین**

**دانشکده پیراپزشکی**

**پایان نامه جهت اخذ درجه ی کارشناسی ارشد (MSc) در رشته ی بیوتکنولوژی پزشکی**

## **عنوان:**

**طراحی نانوپروب طلا برای شناسایی ژن lasB باکتری سودوموناس**

**آیروژینوزا**

**استاد راهنما:**

**دکتر حسین احمدپور یزدی**

**استاد مشاور:**

**دکتر امیر پیمانی**

**نگارش:**

**علیرضا فرهنگی**

**سال تحصیلی ۹۹-۹۸**

## چکیده

**سابقه و هدف:** باکتری سودوموناس آیروژینوزا یکی از عوامل مهم ایجاد عفونت بیمارستانی است. این باکتری فاکتور بیماریزایی بسیار مهمی به نام ژن *lasB* دارد که محصول این ژن باعث تخریب بافت ها، تعدیل سیستم ایمنی و رشد بیوفیلم می شود. با اینکه روش های مولکولی برای شناسایی این ژن وجود دارد ولی به علت هزینه های بالا و نیاز به تجهیزات گران قیمت و افراد متخصص، لازم است که یک روش تشخیصی مناسب جایگزین بشود. اخیرا از روش رنگ سنجی مبتنی بر تجمع نانوذرات طلای کنژوگه شده با DNA (نانوپروب) در آنالیز اسید نوکلئیک بهره گرفته شده است. این روش به این دلیل استفاده می شود که تجمع نانوذرات با چشم غیر مسلح قابل مشاهده است و می توان با استفاده از طیف فرا بنفش-نور مرئی آنالیز را انجام داد. هدف این مطالعه، شناسایی ژن *lasB* باکتری سودوموناس آیروژینوزا توسط روش رنگ سنجی مبتنی بر نانوذرات طلا می باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه، ابتدا نانوذرات طلا تولید شدند و سپس با اتصال پروب تیوله که مکمل بخشی از ژن *lasB* می باشد، نانوپروب ها ایجاد شدند. سپس این نانو پروب ها برای سنجش شبیهی از غلظت های ژن *lasB* تکثیر شده (۷۰-۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) و ژنوم استخراجی باکتری سودوموناس آیروژینوزا (حاوی ژن *lasB*) (۳۵۰-۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) مورد استفاده قرار گرفتند. پس از اثر القایی نمک منیزیم کلرید، تجمع و تغییر رنگ نانوذرات توسط چشم غیر مسلح، طیف اسپکترومتری و آنالیز طیف ها شامل پهنای پیک در نصف مقدار بیشینه (FWHM)، میزان جا به جایی موقعیت پیک پلاسمون، شدت تجمع و شدت پیک مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** مشاهدات بصری و نیز بررسی های طیف سنجی، بیانگر حفظ رنگ و شدت تجمع پایین در نمونه های مثبت، بعد از اضافه کردن القاگر بود که نشان دهنده ی توانایی نانوپروب در تشخیص مولکول هدف می باشد. محدوده ی تشخیصی استفاده شده در شیب غلظتی بین ۷۰ - ۵ نانوگرم در میکرولیتر (ژن تکثیر شده) و ۳۵۰ - ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر (ژن تکثیر نشده) بود. در این محدوده ها با کاهش غلظت توالی هدف، میزان هیبریداسیون کاهش پیدا می کند که منجر به افزایش جزئی شدت تجمع نانوپروب ها، پهنای پیک در نصف مقدار بیشینه، کاهش شدت پیک و نیز تغییر رنگ نسبی نانوپروب با یک روند وابسته به غلظت، می شود. در مقابل نمونه های حاوی ژن تکثیر شده غیر مرتبط، ژنوم استخراجی غیر مرتبط و کنترل منفی به علت عدم هیبریداسیون نانوپروب با مولکول هدف، افزایش چشمگیری در شدت تجمع و مقدار FWHM مشاهده شد. همچنین میزان جابجایی پیک به سمت طول موج های بلند تر (red shift) افزایش یافته و شدت پیک به میزان قابل توجهی کاهش یافت. مقایسه پارامترهای فوق بین نمونه های مثبت و کنترل منفی نشان دهنده ی تفاوت معنا داری بود ( $p < 0.01$ ).

**بحث و نتیجه گیری:** این روش اختصاصیت بالایی دارد و حساسیت آن نیز با محدوده ی تشخیصی<sup>۱</sup> ۵ نانوگرم در میکرولیتر از ژن تکثیر شده و ۵۰ نانوگرم از ژن تکثیر نشده، مطلوب می باشد. این روش، یک روش کم هزینه، سریع می باشد که نیازی به تجهیزات گران قیمت و افراد متخصص ندارد.

**کلید واژه ها:** نانوذرات طلا، باکتری سودوموناس آیروژینوزا، ژن lasB، رنگ سنجی

---

<sup>1</sup> Limit of detection

## **Design of gold Nano probe for the detection of *Pseudomonas Aeruginosa* elastase gene (lasB)**

**Back ground:** *Pseudomonas aeruginosa* is one of the important causes of nosocomial infection. This bacterium has a very important virulence factor called lasB gene that its product causes tissue damage, immune modulation and biofilm growth. Although there are molecular methods for detecting this gene, due to its high cost and the need for expensive equipment and specialized personnel, it is necessary to replace a suitable diagnostic method. Recently, a colorimetric method based on the accumulation of DNA-conjugated gold nanoparticles (nano probe) has been used in nucleic acid analysis. This method is used because of the fact that the aggregation of nanoparticles are visible to the naked eye and can be analyzed by UV- Vis spectra. The aim of this study was to identify the lasB gene of *Pseudomonas aeruginosa* by gold nanoparticle based colorimetric method.

**Method:** In this study, gold nanoparticles were first produced and then nanoprobe were created by attaching a thiol probe that complement a part of the lasB gene. These nanoprobe were then used to measure the amplitudes of the lasB amplified gene (5-70 ng /  $\mu$ l) and the extracted genome of *Pseudomonas aeruginosa* (containing the lasB gene) (50- 350 ng /  $\mu$ l). After the induction effect of magnesium chloride salt, the nanoparticles accumulation and color changing were evaluated by naked eye, spectrometry and spectrum analysis including FWHM, peak position shift rate, Intensity of aggregation and peak intensity.

**Results:** Visual observations as well as spectroscopic studies indicated that color and intensity of low aggregation in positive samples maintained after adding the inducer indicating the ability of nanoprobe to detect the target molecule. The diagnostic range used in the concentration gradient was between 5 - 70 ng /  $\mu$ l (amplified gene) and 50 - 350 ng /  $\mu$ l (non-amplified gene). In these ranges, by decreasing the target sequence concentration, the amount of hybridization decreases, which leads to a slight increase in the accumulation intensity of the nanoprobe, Full width at half maximum, a decrease in the peak intensity, as well as the relative color change of the nanoprobe in a concentration-dependent fashion. In contrast, samples containing unrelated amplified genes, unrelated extracted genomes, and negative controls, there was a significant increase in aggregation intensity and FWHM due to non-hybridization of the nano probe with the target molecule. Also, the peak displacement toward longer wavelengths (red shift) increased and the peak intensity decreased significantly. Comparison of above parameters between positive samples and negative controls showed significant difference ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** This method has high specificity and its sensitivity is favorable with a diagnostic range of 5 ng / ul of amplified gene and 50 ng/ul of non-amplified gene. This is a fast, low-cost method that does not require expensive equipment and specialized personnel.

**Keywords:** Gold nanoparticles, *Pseudomonas aeruginosa*, lasB gene, Colorimetric